

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[21] 申请号 200580025345.1

[43] 公开日 2007年6月27日

[11] 公开号 CN 1989412A

[22] 申请日 2005.7.13

[21] 申请号 200580025345.1

[30] 优先权

[32] 2004.7.26 [33] JP [31] 217387/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/012932 2005.7.13

[87] 国际公布 WO2006/011363 日 2006.2.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.26

[71] 申请人 大塚制药株式会社

地址 日本东京

共同申请人 株式会社 JIMRO

[72] 发明人 小关靖 齐藤史郎

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 杨青 樊卫民

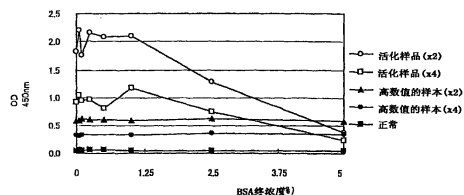
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

清除粘附性微泡的方法

[57] 摘要

用于选择性测定仅在血中的微泡的方法，其通过用白蛋白预处理血源性样本以选择性消除只被人工操作活化的血小板所释放的微泡来进行。



1. 血源性样本的预处理方法，其用于消除血样采集后血源性样本中产生的粘附性微泡的影响，特征在于将白蛋白加入血源性样本中。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中白蛋白是BSA。

3. 血源性样本中循环微泡的免疫分析方法，包括通过将白蛋白加入血源性样本中消除血样采集后在血源性样本中产生的粘附性微泡影响的步骤，以及对血源性样本中的循环微泡进行免疫学分析的步骤。

4. 根据权利要求3所述的方法，其中所述的循环微泡通过将抗所述的循环微泡的抗体，与对所述微泡特异的表面表位连接，并测定由此结合的抗体的水平而进行免疫学分析。

5. 根据权利要求4所述的方法，其中所述的表面表位存在于循环微泡的糖蛋白上。

6. 根据权利要求5所述的方法，其中所述的表面糖蛋白是GpIb-IX。

7. 根据权利要求6所述的方法，其中所述的抗体根据与抗体结合的标记或酶来检测。

8. 根据权利要求7所述的方法，其特征在于包含了如下步骤，其中循环微泡与抗GpIX的固定抗体结合，随后使识别微泡上GpIb的抗体反应。

9. 测定血源性样本中循环微泡的试剂盒，其至少包括白蛋白、标记的抗GpIb抗体和抗GpIX抗体。

10. 根据权利要求 9 所述的试剂盒，其中所述的白蛋白为 BSA。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的试剂盒，其中所述的抗 GpIX 抗体包被在板中。

清除粘附性微泡的方法

技术领域

本发明涉及血源性样本中产生的粘附性微泡的预处理方法，该方法在测定微泡时不影响在血样采集前存在于血中的循环微泡的测定，还涉及正确测定循环微泡的方法，及其用于测定的试剂或试剂盒。

背景技术

当在动脉粥样硬化症、弥散性血管内凝血症以及这类病症中血栓形成时，活化的血小板释放微泡。已知微泡有各种功能，如通过凝血因子与膜表面上的磷脂结合/聚集而促进凝血的作用，对单核细胞、血小板和各种内皮细胞的活化作用，以及白细胞-血小板/白细胞-白细胞/内皮细胞-白细胞的粘附促进作用。因此，微泡不仅被认为是血小板活化的标记，还与血栓形成和动脉硬化的进展密切相关（见非专利文件1）。因而，对于以时间推测涉及上述事件的疾病的状况，重要的诊断方法之一就是测定血液中微泡的量。但是，血小板易于被物理刺激活化，据此，微泡从活化的血小板中释放。例如，由于取血样时或者血浆或血清的分离过程中的物理震动，污染的血小板被活化，从而增加了并不反映取血样后血源性样本的临床状况的微泡。这些微泡增加了血源性样本中存在的微泡量，并导致难以准确判定患者病状。因此，需要一种方法，其能通过消除取血样后产生的微泡的影响而准确测定取血样前血中的微泡。

非专利文件 1: Nomura S., Int. J. Hematol., 74:397-404, 2001

发明内容

本发明要解决的问题

为了解决血样采集后，血源性样本在制备中产生的微泡（粘附性微泡）所导致的上述问题，本发明的目的是提供消除粘附性微泡的方

法，利用此方法正确测定血液中循环微泡的方法，及其用于测定的试剂。

所述问题的解决方法

根据这种实际情况，经过渗入研究，本发明的发明人已发现，典型为 BSA（牛血清白蛋白）的白蛋白与血样采集后产生的微泡（粘附性微泡）产生特异性相互作用，以消除其在免疫分析中的影响，并有助于通过免疫分析正确测定仅存在于血样采集之前的微泡（循环微泡）。本发明完全以前述结果为基础，并具体提供以下发明。

[1] 血源性样本的预处理方法，其用于消除血样采集后血源性样本中产生的粘附性微泡的影响，特征在于将白蛋白加入到血源性样本中。

[2] 根据[1]所述的方法，其中所述的白蛋白是 BSA。

[3] 血源性样本中循环微泡的免疫分析方法，其包括通过将白蛋白加入血源性样本中消除血样采集后在血源性样本中产生的粘附性微泡的影响的步骤，以及对血源性样本中的循环微泡进行免疫学分析的步骤。

[4] 根据[3]所述的方法，其中所述的循环微泡通过将抗所述循环微泡的抗体与对所述微泡特异的表面表位连接，并测定由此结合的抗体水平而进行免疫学分析。

[5] 根据[4]所述的方法，其中如上所述的表面表位存在于循环微泡的糖蛋白上。

[6] 根据[5]所述的方法，其中如上所述的表面糖蛋白是 GpIb-IX。

[7] 根据[6]所述的方法，其特征在于所述的抗体根据结合抗体的标记或酶来检测。

[8] 根据[7]所述的方法，其特征在于包含如下步骤，其中循环微泡与抗 GpIX 的固定抗体结合，随后使识别微泡上 GpIb 的抗体反应。

[9] 测定血源性样本中循环微泡的试剂盒，其至少包括白蛋白、标记的抗 GpIb 抗体和抗 GpIX 抗体。

[10] 根据[9]所述的试剂盒，其中所述的白蛋白为 BSA。

[11] 根据[9]或[10]所述的试剂盒，其中所述的抗 GpIX 抗体被包被于板中。

本文中，患者血液中的微泡称作“循环微泡”，而在血样采集期间或之后因人工操作而活化的血小板上释放的微泡，因其与白蛋白有亲和力，称作“粘附性微泡”。

本发明提出的血源性样本指含有血液或从该血液中制备的一种或多种血液成分的溶液，并优选其中的血小板已被清除的样本。具体而言，该样本可以包括血浆，还可以根据血份的测定，包含以生理盐水或缓冲液稀释而得到溶液。

所述的白蛋白指来源于人类、除人类以外的哺乳动物和鸟类的白蛋白，除人类以外的哺乳动物可以包括，例如，牛、马、猴、狗、兔和鼠，鸟类可以包括鸡作为典型的例子。特别是可包括作为典型例子的牛血清白蛋白（BSA），另外，可包括人血清白蛋白（HAS）和卵清蛋白作为合适的例子。

对于加入所述白蛋白的时间，白蛋白可以在测定前加入血源性样本中，并且例如在 ELISA 方法中，所述白蛋白可以在抗体固化到板上后加入。对于加入的形式没有特别的限制，但是优选以液态加入，并且将所述白蛋白事先溶解在生理盐水或等渗缓冲液中，然后可以将其加入。待加入的白蛋白的量优选 5%或以上的终浓度，例如，典型的终浓度约为 5 至 10%。加入后，优选静置或摇晃使得粘附性微泡吸附到所述白蛋白上，优选进行所述白蛋白的处理一小时或更久，并优选 4 小时或更久。因此，人工活化的血小板释放的微泡与所述白蛋白相互作用，通过利用微泡膜表面抗原的抗体而将其清除出免疫分析系统，并对循环微泡的测定基本没有影响。

以白蛋白处理基本不影响血源性样本中原有的循环微泡，并且该

循环微泡能通过利用微泡特性的标准免疫分析来测定。

只要免疫方法的程序是，以微泡膜表面上的抗原分子（表位）为基础，通过利用抗该表位的抗体和通过量化所述分子，进行微泡的测定和量化，则免疫方法不受特别限制。例如，典型的 ELISA 法、RIA 法或聚集法。

本发明优选的抗体可以包括抗 GpIb-GPIX 复合体和/或糖蛋白（包括个体糖蛋白、GpIb 或 GpIX）的抗体。在微泡上观察到的对所述血小板特异的其他糖蛋白包括 GpIa-IIa、GpIIb-IIIa 和 GpIIIb。

结合于循环微泡的抗体本身可被标记，或者可以采用标记的第二抗体，如，与鼠单克隆抗体（第一抗体）特异结合的标记的抗鼠免疫球蛋白。多克隆抗体或单克隆抗体均可用，但优选采用单克隆抗体。所述的标记物可以是能够给出信号的任何成分，如，酶（过氧化物酶，碱性磷酸酶等）、发色团、荧光团（FITC 等）、放射性同位素、着色颗粒物、染料、胶态金属等。

此外，本发明的一个实施方案将在下文中通过实施采用例如 BSA 的 ELISA 而详细描述。

将上述所制备的血源性样本成分的 10 至 150 μ l 的等分试样加入 96 孔板的每一孔中，所述 96 孔板已事先用抗 GpIX 抗体包被并给予脱脂奶封闭，然后，向其中加入 BSA 溶液，形成 5%的终浓度。之后，为了将新产生的粘附性微泡吸附到 BSA 上，所述板在室温下或 37 $^{\circ}$ C 下培养一小时或更久，优选 4 小时或更久。随后，用清洗溶液，如大约 0.02 至 0.1%的 Tween 20/PBS，彻底清洗该板。然后，加入过氧化物酶标记的抗 GpIb 抗体。用同样的清洗溶液彻底清洗该板。然后加入所述酶的底物以产生颜色。因此，通过利用基于膜表面表位 GpIb-GpIX 复合体的抗体，就可能以酶反应产生的着色底物的量来定量循环微泡的

量。通过上述操作，人工操作产生的粘附性微泡被 BSA 俘获，并与系列免疫分析所用的抗体不产生反应。从而可能仅测定原来存在于血中的目标循环微泡。

可以提供一种用于测定循环微泡的试剂盒，其包含用于上述操作的各种抗体和试剂等。具体而言，在试剂盒中包括以 BSA 为代表的白蛋白或其溶液，用于有效去除人工操作产生的粘附性微泡，识别所述蛋白复合体的抗体，其典型地为抗微泡膜表面上的 GpIb 和 GpIX 的抗体为代表（抗体其一或二者被标记），必要的话，第二抗体和酶底物（当酶作为标记使用时）等。例如，当用于识别的抗体是与生物素结合的抗 GpIb 抗体时，可以包括过氧化物酶标记的抗生物素蛋白作为测定用试剂盒的第二试剂。因此可以提供包括过氧化物酶底物、用于测定循环微泡的试剂盒。

如从下列实施例可以显见的，已经发现，通常在血处理阶段从被污染的活化血小板中释放的粘附性微泡，可以通过用白蛋白预处理而从免疫分析系统中充分清除，而只有原来存在于血中的循环微泡可被测定。

附图说明

图 1 显示了利用人工活化的样本、从具有高度微泡的患者中得到的样本和正常的样本，通过 BSA 进行的粘附性微泡的吸附实验。

本发明的最佳实施模式

本发明将参考实施例进行更详细的描述。该实施例仅用于举例说明而描述，而非限制本发明。

实施例 1

方法：

1. 制备假阳性（活化的）样品

含有 3.8%柠檬酸的全血样品，来自循环微泡（PDMP：血小板源性微粒）值正常的健康成年男性，储存在 4°C 冰箱中 12 小时，以新产生 PDMP（粘附性微泡）。冷却的全血（2mL）用台式离心机以 3000rpm 离心 20 分钟，收集上清液（600 μ L），制成活化样品。该活化样品用生理盐水稀释 2 倍和 4 倍，用于 ELISA。

2. 具有高数值的样本制备

从显示有高 PDMP 值的对象（成年男性）中，用 EDTA/ACD（柠檬酸右旋葡萄糖）制血样（2mL），用台式离心机室温下 3000rpm 离心 20 分钟，收集上清液（600 μ L）。具有高值的样本以生理盐水稀释 2 倍和 4 倍，用于 ELISA。

3. 正常样本的制备

从 PDMP 值显示正常的健康成年男性中，用 EDTA/ACD 制备血样，用台式离心机 3000rpm 离心 20 分钟，收集上清液（600 μ L），用于 ELISA。

4. ELISA

在微泡膜表面上存在的糖蛋白中制备夹心 ELISA 系统，使用对抗 CD42b（GpIb）和 CD42a（GpIX）的抗体（抗 CD42b 抗体：NNKY5-5，抗 CD42a 抗体：KMP-9），所述 CD42b 和 CD42a 为对血小板具有特异性的分子。将活化样本或具有高值的样本的 50 μ L 等分试样加入用于 ELISA 的 96 孔微孔板（由 Corning:MaxiSorb 提供）的每一孔中，该微孔板已被抗 CD42a 抗体包被，随后将 50 μ L PBS，2.5%、5%、7.5%或 10%的 BSA 加入每孔中，形成 BSA 的终浓度为 1.25%、2.5%、3.75%或 5%。板在室温下振荡培养 4 小时。然后，板用清洗液（0.05%Tween 20 /PBS）清洗，加入生物素化的抗 CD42b 抗体，通过加入过氧化物酶标记的抗生物素蛋白形成颜色，用免疫读数仪（Immunoreader）读出 450nm 处的吸光度（图 1）。

结果

在显示假阳性的活化样品中，测定值的降低取决于分析中加入孔中的 BSA 浓度，在 BSA 终浓度为 5% 时，数值降低至接近正常样本的值。同时，起初显示出高数值的具有高值的样本，则无论 BSA 的浓度大小，显示数值不变。从这些结果，已证实血样采集后因为操作而新产生的 PDMP，可以在分析中通过加入终浓度为 5% 的 BSA，被选择性清除。

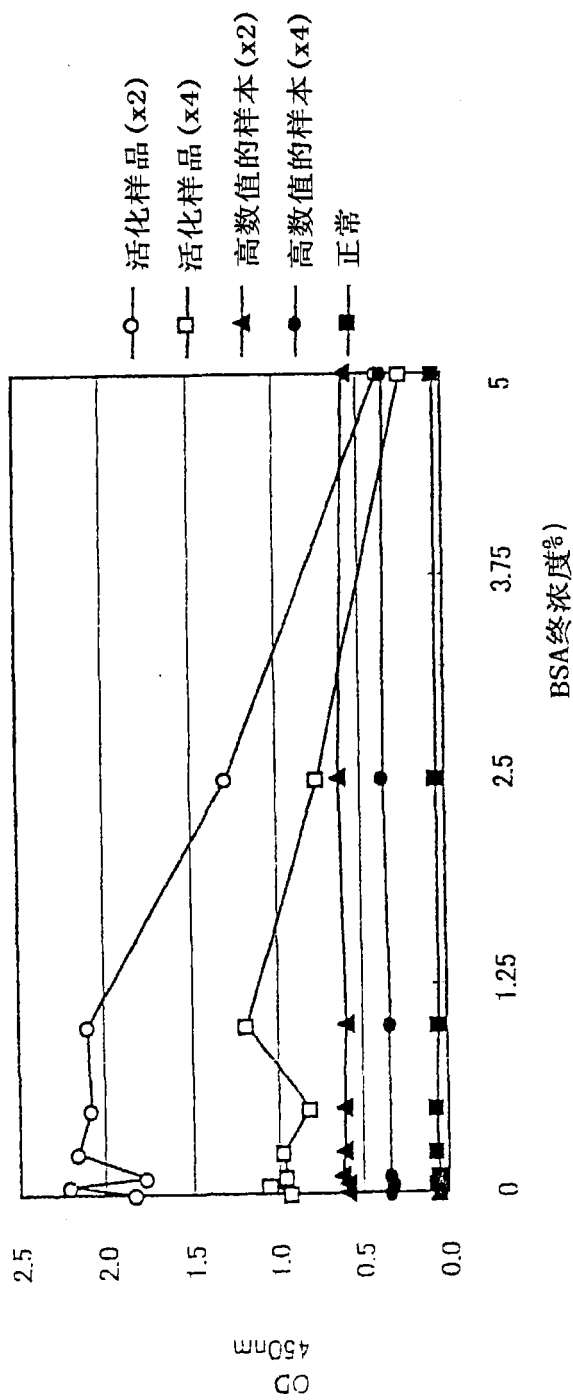


图1

专利名称(译)	清除粘附性微泡的方法		
公开(公告)号	CN1989412A	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200580025345.1	申请日	2005-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社JIMRO		
申请(专利权)人(译)	大冢制药株式会社 株式会社JIMRO		
当前申请(专利权)人(译)	大冢制药株式会社 株式会社JIMRO		
[标]发明人	小关靖 齐藤史郎		
发明人	小关靖 齐藤史郎		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N2400/02 G01N33/86		
代理人(译)	杨青		
优先权	2004217387 2004-07-26 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于选择性测定仅在血中的微泡的方法，其通过用白蛋白预处理血源性样本以选择性消除只被人工操作活化的血小板所释放的微泡来进行。

